

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PCT

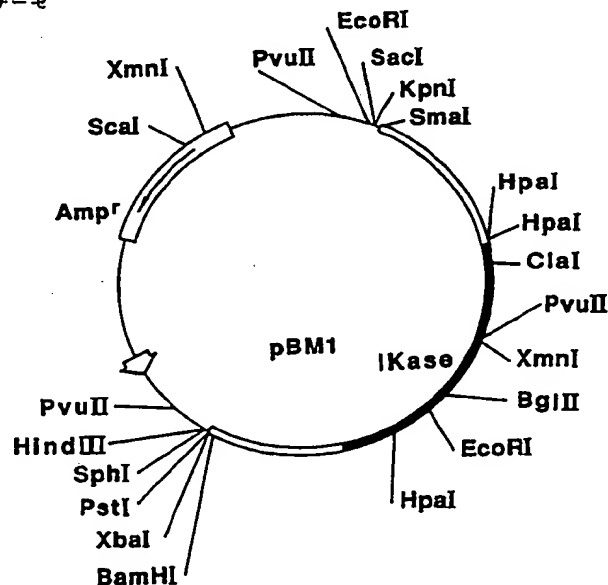
世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C12N 9/12, 15/54, 1/21 C12P 19/32 // (C12N 9/12 C12R 1/19) (C12N 15/54 C12R 1/19) (C12N 1/21 C12R 1/19) (C12P 19/32 C12R 1/19)	A1	(11) 国際公開番号 WO 91/08286 (43) 国際公開日 1991年6月13日(13.06.1991)
(21) 国際出願番号 PCT/JP90/01567 (22) 国際出願日 1990年12月4日(04.12.90) (30) 優先権データ 特願平1/315537 1989年12月5日(05.12.89) JP (71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 協和醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) [JP/JP] 〒100 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 森 英郎(MORI, Hideo) [JP/JP] 飯田章博(IIDA, Akihiro) [JP/JP] 〒194 東京都町田市森野4-17-9 Tokyo, (JP) 手柴貞夫(TESHIBA, Sadao) [JP/JP] 〒194-01 東京都町田市能ヶ谷町1626-9 Tokyo, (JP) 藤尾達郎(FUJIO, Tatsuro) [JP/JP] 〒747 山口県防府市協和町2-8-201 Yamaguchi, (JP) (81) 指定国 AT(欧州特許), BE(欧州特許), CA, CH(欧州特許), DE(欧州特許), ES(欧州特許), FR(欧州特許), GB(欧州特許), GR(欧州特許), IT(欧州特許), JP, KR, LU(欧州特許), NL(欧州特許), SE(欧州特許), US.	添付公開書類 国際調査報告書	

(54) Title : INOSINE GUANOSINE KINASE

(54) 発明の名称 イノシングアノシンキナーゼ



(57) Abstract

An inosine guanosine kinase and a process for producing 5'-nucleotides by using the same, said enzyme catalysing the formation of 5'-inosinic acid (5'-IMP) from inosine and adenosine triphosphate (ATP) or deoxyadenosine triphosphate (dATP) and the formation of 5'-guanylic acid (5'-GMP) from guanosine and ATP or dATP.

(57) 要約

本発明は、イノシンとアデノシン三リン酸（A T P）またはデオキシアデノシン三リン酸（d A T P）とから5'-イノシン酸（5'-I M P）を生成する反応およびグアノシンとA T Pまたはd A T Pとから5'-グアニル酸（5'-G M P）を生成する反応を触媒するイノシングアノシンキナーゼおよび該酵素を用いる5'-ヌクレオチド類の製造法に関する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のハンプレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア
AU オーストラリア
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルキナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
CA カナダ
CF 中央アフリカ共和国
CG コンゴ
CH スイス
CI コート・ジボアール
CM カメルーン
DE ドイツ
DK デンマーク

ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GI ギニア
GB イギリス
GR ギリシャ
HU ハンガリー
IT イタリア
JP 日本
KP 朝鮮民主主義人民共和国
KR 大韓民国
LI リヒテンシュタイン
LK スリランカ
LU ルクセンブルグ
MC モナコ

MG マダガスカル
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
NL オランダ
NO ノルウェー
PL ポーランド
RO ルーマニア
SD スーダン
SE スウェーデン
SN セネガル
SU ソビエト連邦
TD チャド
TG トーゴ
US 米国

明 細 書

イノシングアノシンキナーゼ

技 術 分 野

本発明は、イノシンとアデノシン三リン酸 (ATP) またはデオキシアデノシン三リン酸 (dATP) とから5'-イノシン酸 (5'-IMP) を生成する反応およびグアノシンとATPまたはdATPとから5'-グアニル酸 (5'-GMP) を生成する反応を触媒するイノシングアノシンキナーゼおよび該酵素を用いる5'-ヌクレオチド類の製造法に関する。

背 景 技 術

5'-ヌクレオチド類、とりわけ5'-IMPと5'-GMPは強い呈味性を示し、調味料として広く利用されている。5'-ヌクレオチド類の製法としては、酵母菌体に存在するRNAを酵素的に分解する方法 (日本農芸化学会誌、34巻、489頁、1969年)、5'-IMPを生産する能力を有する微生物を培養する方法 [アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリィ (Agricultural and Biological Chemistry)、46、2557(1982)]、イノシンやグアノシンなどのヌクレオシド類を化学的にリン酸化する方法 [ブリティン・オブ・ザ・ケミカル・ソサエティー・オブ・ジャパン (Bulletin of the Chemical Society of Japan)、42、3505~3508(1969)] などが知られている。現在では、イノシン、グアノシンが発酵法によって容易に得られるためそれらを利用した化学的リン酸化法が工業的には最も有利だと考えられている。しかしながら、化学的リン酸化を行う場合、低温下で大量の塩化物を使用する [ブリティン・オブ・ザ・ケミカル・ソサエティー・オブ・ジャパン (Bulletin of the Chemical Society of Japan)、42、3505~3508(1969)] ので、コスト的にも環境衛生的にも望ましくない。したがって、酵素による温和な条件下でのヌクレオシド類のリン酸化が望まれている。従来より各種微生物の培養菌体を用

いたプリンヌクレオシドの生化学的リン酸化が報告されている（特開昭58-116698、特開昭63-230094）が、それらは転換率および収量の面で化学的リン酸化を凌ぐものではない。

イノシンのリン酸化酵素としてイノシンキナーゼ（EC2.7.1.73）が知られているが、動物組織や微生物由来の粗精製活性画分が報告されている程度〔ディ・エンザイムス（The Enzymes）Vol. IX、54-56（1973）、Academic Press、またはヌクレオサイズ・アンド・ヌクレオベース・イン・マイクロオーガニズムズ（Nucleosides and Nucleobases in Microorganisms）、PP.66、（1983）、Academic Press〕である。また、グアノシンをリン酸化するグアノシンキナーゼ活性も大腸菌でその存在が示唆されている〔ジャーナル・オブ・ジェネラル・マイクロバイオリジィ（J.Gen.Microbiol.）135、1263-1273（1989）〕。しかし、その活性は低く、精製が非常に困難で工業的に利用できるものではない。しかも酵素の物理化学的性質は明らかにされていない。いずれにしてもイノシングアノシンキナーゼは単離精製されたことのない酵素である。

本発明の目的はイノシングアノシンキナーゼを提供し、さらに調味料として広く利用されている5'-ヌクレオチド類、とくに5'-IMPおよび5'-GMPを、工業的に安価に製造する方法を提供することにある。

発 明 の 開 示

本発明によれば、イノシンまたはグアノシンとATPまたはdATPとから5'-IMPまたは5'-GMPを生成する反応を触媒するエッシェリヒア属に属する微生物由来のイノシングアノシンキナーゼ、該酵素の製造法および該酵素を用いた5'-ヌクレオチド類の製造法を提供することができる。

以下に本発明を詳細に説明する。

本発明にかかわるイノシングアノシンキナーゼは、エッシェリヒア

3

属に属し、イノシングアノシンキナーゼを生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養物中にイノシングアノシンキナーゼを生成蓄積させ、該培養物からイノシングアノシンキナーゼを採取することにより得られる。

用いられる微生物としては、エッシェリヒア属に属し、イノシングアノシンキナーゼを生産する能力を有する微生物であれば天然界から入手できる微生物でも、遺伝子組換えによって得られる微生物でもいづれでもよい。

以下に、遺伝子組換えによる本発明微生物の取得方法および該微生物を用いるイノシングアノシンキナーゼの製造法について示す。

エッシェリヒア属に属する微生物由来の染色体DNAを精製し、イノシングアノシンキナーゼをコードする遺伝子をクローニングし、遺伝子組換え技術を用いてイノシングアノシンキナーゼ活性を高めた菌株を作製して該菌株を培養することにより、イノシングアノシンキナーゼを得る。

エッシェリヒア属菌種由来のイノシングアノシンキナーゼをコードする遺伝子の精製およびクローニングは、下記のようにしておこなうことができる。すなわち、通常のDNA単離法、例えばフェノール法〔バイオキミカ・エ・バイオフィジカ・アクタ (Biochim. Biophys. Acta) 72, 619-629 (1963)〕により、エッシェリヒア属菌種の染色体DNAを精製する。得られた染色体DNAを適当な制限酵素、例えばBamHI、Sau3AI、BglIIなどにより切断し、該制限酵素切断断片をベクターDNAに組み込むことにより、エッシェリヒア属菌種由来のイノシングアノシンキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を組み込んだ組換え体DNAを、種々の組換え体混成物とともに得ることができる。イノシングアノシンキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を組み込んだ組換え体DNAを含む上記組換え体混成物を用いて、コーエンらの方法〔Cohen et al.; プロシーディング・

オブ・ザ・ナショナル・アカデミィ・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.) 69, 2110 (1979)] に従い、宿主微生物を形質転換する。

イノシングアノシンキナーゼをコードする遺伝子の供給源としては、エッシェリヒア属に属する微生物の染色体 DNA があげられる。具体的にはエッシェリヒア・コリ HM 7 0 株、エッシェリヒア・コリ W 3 1 1 0 株 [モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー (1982) ; A T C C 14948] などを例示することができる。

イノシングアノシンキナーゼをコードする遺伝子を含有する DNA 断片を担持するベクターとしては、エッシェリヒア属菌種中で自律複製できるものであればファージ・ベクター、プラスミド・ベクターなどいずれでも使用できる。好適には p B R 3 2 2 [ジーン (Gene)、2, 95 (1977)]、p U C 1 9 [ジーン (Gene)、33, 103 (1985)]、p T r S 3 0 [西 達也博士論文 (1988)、pp. 130 東京大学] などを例示することができる。

宿主微生物としては、エッシェリヒア属に属し、エッシェリヒア属菌種のイノシングアノシンキナーゼをコードする遺伝子をベクターに組み込んで得られる組換え体 DNA を導入できるものであればいずれでもよい。具体的には、エッシェリヒア・コリ HM 7 0 株、エッシェリヒア・コリ MC 1 0 0 0 株 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. of Molecular Biology)、138, 179-207 (1980)]、エッシェリヒア・コリ DH 1 株 [モレキュラー・クローニング、505、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー (1982)] などがあげられる。

また、上記のようにして得られたエッシェリヒア属菌種由来のイノシングアノシンキナーゼをコードする遺伝子を含む組換え体 DNA より、該遺伝子を他菌種の宿主・ベクター系を用いてサブクローニング

することにより、該遺伝子を他菌種に導入することも可能である。

宿主・ベクター系としては、従来知られているものはすべて用いることができる。たとえば、セラチア属、コリネバクテリウム属、プレビバクテリウム属、シュードモナス属、バチルス属などの宿主・ベクター系があげられる。

イノシングアノシンキナーゼをコードする遺伝子の供給源の一つであるエッシュェリヒア・コリ HM 7 0 株は、国立遺伝学研究所から入手したエッシュェリヒア・コリ S 中 6 0 9 株 [モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molec. Gen. Genet.), 143, 85~91, (1975)] のヌクレオシド分解活性の一部を、紫外線処理により遺伝子レベルで破壊した株である。この HM 7 0 株は遺伝子の供給源としてだけでなく、遺伝子のクローン化宿主としても用いられる。

HM 7 0 株の選択は以下のようにしておこなった。S 中 6 0 9 株は、イノシン分解活性を有するので、イノシン添加平板培地で生育させた場合、イノシンを分解し、ヒポキサンチンとリボースを生成する。また S 中 6 0 9 株はリボースを糖源として用いることもできるので、イノシンを添加した糖代謝検定プレート (イノシン添加マッコンキープレート) 上で生育させた場合、リボースを資化してコロニーが赤く着色する。そこで、S 中 6 0 9 株をイノシン添加マッコンキープレート上に塗布し、死滅率 9 5 % 程度になるよう紫外線照射をおこなって変異を誘導すると白いコロニーが生育してくる。生育してきた白いコロニーはリボース生成能の低下した株、すなわちイノシン分解能の低下した株である。それらの中で最もイノシン分解活性の低下していた株を選択し、HM 70 株と命名した。

S 中 6 0 9 株および HM 7 0 株は、プリンヌクレオチド生合成系およびヒポキサンチンから 5'-IMP を生成するサルベージ系が欠落しているので、ヒポキサンチンを添加した最少寒天平板培地上では生育できない。しかしながら、イノシン分解活性が S 中 6 0 9 株の 1/4 程度

6

に低下しているHM70株は、イノシンを利用できるようになっているので、SΦ609株が生育できないイノシン添加最少寒天平板培地〔 Na_2HPO_4 6 g、 KH_2PO_4 3 g、 NaCl 0.5 g、 NH_4Cl 1 gおよび寒天15 gを1ℓの蒸留水に溶かし、1N NaOH でpHを7.4に調整後、オートクレーブで滅菌し、その後、1M MgSO_4 2 ml、20%グルコース10 mlおよび1M CaCl_2 0.1 mlの滅菌溶液を添加し作成した平板培地（イノシンを終濃度5 mMになるように添加）〕上でもHM70株は生育することができる。ただしこの生育回復は、HM70株が元来保有する微弱なイノシングアノシンキナーゼ活性によるものであり、その生育速度は非常に遅い。このHM70株に、イノシングアノシンキナーゼ構造遺伝子をプラスミドベクターにつないで導入すると、菌体内のイノシングアノシンキナーゼ活性が上昇し、イノシン添加最少寒天平板培地上での生育が促進される。一方親株SΦ609は、強いイノシン分解活性を有しており、培地中のイノシンを分解してしまうため、たとえイノシングアノシンキナーゼをプラスミドベクターにつないで導入しても、イノシン添加最少寒天平板培地上では生育することはできない。

このようにして得られた形質転換株よりイノシンまたはグアノシンとATPまたはdATPとから5'-IMPまたは5'-GMPを生成する反応を触媒する活性を有する株を次のように選択する。

得られた形質転換株に有機溶媒処理を施し膜透過性を付与させた処理物を酵素源として、イノシンまたはグアノシンとATPまたはdATPとから5'-IMPまたは5'-GMPを生成する反応をおこない、生産される5'-IMPまたは5'-GMPの量を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で定量する。5'-IMPまたは5'-GMPの生産量が上昇している株がイノシングアノシンキナーゼクローン化株である。またHM70株を宿主とする形質転換株をイノシン添加最少寒天平板培地上に塗布し30℃で保温する場合は、2～3日で数個の生育

7

の速いコロニーが出現する。これらの生育良好株のほとんどはイノシングアノシンキナーゼクロン化株である。得られた形質転換株より、保有する組換え体DNAを分離することにより、エッシェリヒア属菌種由来のイノシングアノシンキナーゼをコードする遺伝子を含む組換え体DNAを取得することができる。

イノシングアノシンキナーゼ活性を高めた菌株としては、エッシェリヒア・コリHM70株由来のイノシングアノシンキナーゼをコードする遺伝子をベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有するエッシェリヒア・コリHM70/pBM2、エッシェリヒア・コリW3110株由来のイノシングアノシンキナーゼをコードする遺伝子をベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有するエッシェリヒア・コリDH1/pBM1などがあげられる。エッシェリヒア・コリHM70/pBM2はエッシェリヒア・コリHM72として、エッシェリヒア・コリDH1/pBM1はエッシェリヒア・コリHM1として、工業技術院微生物工業技術研究所にブダペスト条約に基づいて第1表のとおり寄託されている。

第 1 表

微生物識別表示	微工研条寄番号 (FERM BP-)	寄 託 日
エッシェリヒア・ コリHM72	3 1 2 5 号	平成2年10月6日
エッシェリヒア・ コリHM1	2 6 6 9 号	平成元年12月1日

これらのようなイノシングアノシンキナーゼ活性を高めた菌株の培養は、通常の細菌の培養方法に従っておこなう。すなわち該微生物を、炭素源、窒素源、無機物、アミノ酸、ビタミンなどを含有する通常の培地において、好氣的条件下で温度、pHなどを調節しつつ培養すればよい。

培地に用いる炭素源としては、例えばグルコース、フラクトース、

シュクロース、糖蜜、廃糖蜜、澱粉加水分解物などの炭水化物、エタノール、グリセリン、ソルビトールなどのアルコール類、ピルビン酸、乳酸、酢酸などの有機酸、グリシン、アラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸などのアミノ酸など、該微生物が資化可能なものであればいずれでも使用できる。これらの使用濃度は5～30%が好ましい。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウムなどの各種無機および有機アンモニウム塩、尿素、ペプトン、NZアミン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、フィッシュミールまたはその消化物などの窒素含有有機物、グリシン、グルタミン酸などの各種アミノ酸など種々のものが使用できる。その使用濃度は通常0.1～10%である。

無機物としては、リン酸1カリウム、リン酸2カリウム、硫酸マグネシウム、リン酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、炭酸カルシウムなどを用いることができる。

用いる微生物がアミノ酸、核酸、ビタミンなど特定の栄養物質を生育に要求する場合には、培地にこれらの物質を適量添加する。

培養は、振盪培養または通気攪拌培養などの好氣的条件下に行う。培養温度は、一般に28～32℃が最適である。培養期間は、通常1～24時間である。培地のpHはアンモニア、尿素、水酸化ナトリウム溶液などで中性に保つことが望ましい。

培養終了後、一般の酵素採取法、例えば次のようにして培養物よりイノシグアナシンキナーゼを単離することができる。まず得られた菌体を充分洗浄した後、超音波処理等無細胞抽出液を得る。遠沈後の上清に硫酸プロタミンを加え、遠心し高分子核酸を沈澱として除去する。上清をセファデクスG-50に添加して、ゲル濾過による脱塩を行う。続いてDEAEセファロースを用いた陰イオン交換クロマト

グラフィー処理、セファクリルS-200によるゲル濾過を行い、精製標品を得る。

本明細書中の各緩衝液成分は次の化合物を示す。

HEPES : N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-エタンスルホン酸

PIPES : ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)

TAPS : N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノ-1-プロパンスルホン酸

CHES : シクロヘキシルアミノエタンスルホン酸

得られたイノシングアノシンキナーゼの活性の測定は、次のように行う。100 mM HEPES緩衝液(pH 7.2)、10 mM $MgSO_4$ 、50 mM KCl 、1 mM ATPおよび1 mMイノシンの組成からなる反応液(以下、反応液aという。)とイノシングアノシンキナーゼを10 μg 蛋白/ ml 程度の濃度で接触させ、30℃で30分間程度反応させる。その間経時的に反応液の一部をサンプリングし、0.2 M NaH_2PO_4 (H_3PO_4 でpH 2.6に調整)で1/20に希釈し反応を停止させ、その反応停止液中の5'-IMP量をHPLCで定量した。HPLCにおける分析は、溶出液として0.2 M NaH_2PO_4 (pH 2.6)を流速1 ml/min .で用い、カラムはAsahipak GS-320H(旭化成社製)を使用した。成分の検出は、UV 254nmの吸光度を指標にした。また定量は、吸光強度をスタンダードと比較することにより行った。

次に得られたイノシングアノシンキナーゼの理化学的性質について記載する。

(1) 作用

ATPとイノシンからADPと5'-IMPを生成する作用、dATPとイノシンからdADPと5'-IMPを生成する作用、ATPとグアノシンからADPと5'-GMPを生成する作用およびdATPとグアノシンからdADPと5'-GMPを生成する作用を併有する。

(2) 至適pH

前記イノシングアノシンキナーゼ活性測定法において反応液aの組

成中、緩衝液成分 (100 mM) を PIPES (pH 6.6 ~ 7.1)、HEPES (pH 6.9 ~ 8.3)、TAPS (pH 7.9 ~ 8.8) CHES (pH 8.7 ~ 10.1) に置き換え、30℃で20分間反応を行った結果、至適 pH は 6.9 ~ 8.2 であった。

(3) pH 安定性

本酵素を 50 mM 緩衝液 (CHES ; pH 10.0 ~ 9.0、TAPS ; pH 8.2、HEPES ; pH 8.3 ~ 7.3 あるいは PIPES ; pH 6.6) および 5 mM β -メルカプトエタノールを含む水溶液中で、KCl 無添加、250 mM KCl 添加の両条件下、4℃、16時間処理する。処理後、活性を測定する。pH 6.6 ~ 9.0 の範囲で処理した場合、処理酵素は無処理標品の活性の 90% 以上の残存活性を保持しており、pH 6.6 ~ 9.0 の範囲で安定に活性が保たれる。また、KCl の添加は保存安定性を促進する。

(4) 至適温度

前記イノシングアノシンキナーゼの活性測定法中、温度を 0 ~ 50℃、および 31 ~ 41℃まで変化させて活性を測定したところ、至適温度は 25 ~ 40℃である。

(5) 温度安定性

20% グリセロール、50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8)、5 mM β -メルカプトエタノールおよび 100 mM NaCl の組成からなる反応液とイノシングアノシンキナーゼを 10 μ g 蛋白 / ml 程度の濃度で接触させ、26 ~ 50℃で15分間処理し、各温度における残存活性を測定した結果、40℃までは、活性の消失が 20% 以下で安定である。50℃の処理では活性は速やかに消失する。

(6) 基質特異性

前記イノシングアノシンキナーゼ活性測定法において反応液 a の組成中、KCl を 300 mM にし、ATP の代わりに中和処理を施した種々のリン酸源を終濃度が 5 mM となるように添加し、30℃で反応

を行った。第1図に示したように、ATPまたはdATPを良いリン酸基供給基質として反応が進行する他、ウリジン三リン酸(UTP)添加の場合も若干反応が進行する。しかしながら、アデノシン二リン酸(ADP)、アデノシンモノリン酸(5'-AMP)、グアノシン三リン酸(GTP)、オロット酸モノリン酸(5'-OMP)、シチジンモノリン酸(5'-CMP)、パラニトロフェニルフォスフェート(PNPP)、アセチルリン酸、トリポリリン酸、テトラポリリン酸、ピロリン酸、リン酸はリン酸基供与基質とはならなかった。このことは本酵素がキナーゼと称される酵素群に属し、特開昭58-119898、特開昭63-230094等で用いられているリン酸基転移反応を司る酵素すなわち、ヌクレオシドリン酸転移酵素(EC 2.7.1.77)とは明確に区別されることを示す。ATPまたはdATPをリン酸基供与基質とした場合、リン酸基受容基質としては、イノシン、グアノシンが好ましい。

(7) 阻害剤

前記イノシングアノシンキナーゼ活性測定法において反応液a組成中、KClを300mMに変更しさらに1mMの金属塩を添加した系で、金属塩無添加を基準とし、30℃、30分の反応で測定した活性を第2表に示した。本酵素は Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 等の金属イオンにより反応が阻害される。

第 2 表

金 属 塩 (1 mM)	相 対 活 性 (%)
無 添 加	1 0 0
F e C l ₂	1 1 2
F e C l ₃	1 3 1
C a C l ₂	1 0 7
C o C l ₂	3 2
C u C l ₂	1
M n C l ₂	1 3 4
B a C l ₂	1 1 6
Z n S O ₄	5
Z n (C H ₃ C O O) ₂	5
N a C l	1 0 4
N a F	9 6

(8) 活性化

前記イノシングアノシンキナーゼ活性測定法において反応液 a の組成中、緩衝液をトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) にし、KCl の濃度を変化させて反応を行った結果を第 2 図に示した。また KCl の代わりに NaCl を 100 mM 添加した場合反応は進行しない。このことから本酵素は活性化のため K⁺ を必要とすることがわかった。次に反応液 a の組成中、KCl を 300 mM に変更した系で、MgSO₄ の代わりに種々の 2 価ないし 3 価金属イオン塩を添加して活性化を調べたところ、第 3 表に示すように、Mg²⁺、Mn²⁺ に活性化作用があった。よって本酵素が K⁺ と Mg²⁺ または K⁺ と Mn²⁺ のいずれかの組合せのイオン群を要求することがわかった。

13

第 3 表

金 属 塩 (10mM)	生成IMP (mM)
無 添 加	0
F e C l ₂	0
F e C l ₃	0
C a C l ₂	0
C o C l ₂	0.01
C u C l ₂	0
M n C l ₂	0.51
B a C l ₂	0
Z n S O ₄	0
Z n (C H ₃ C O O) ₂	0
M g C l ₂	0.60
M n S O ₄	0.64
M g S O ₄	0.68

(9) K_m 値

2 mM ATP、10 mM MgSO₄、300 mM KCl および 0.1 M HEPES 緩衝液 (pH 7.2) の組成からなる反応液中での K_m 値は、イノシンに対して 2.1 mM、グアノシンに対して 6.1 μM であった。

(10) アミノ酸配列および塩基配列

本酵素の構造遺伝子の塩基配列をダイデオキシチェーンターミネーター法 [サイエンス (Science), 214, 1205-1210 (1981), ジーン (Gene), 19, 269-276 (1982)] により決定し、塩基配列からアミノ酸配列を決定した。アミノ酸配列は第 4 表に、塩基配列は第 5 表に示すとおりである。

14

第 4 表

1 MetLysPheProGlyLysArgLysSerLysHisTyrPheProValAsnAlaArgAspPro
21 LeuLeuGlnGlnPheGlnProGluAsnGluThrSerAlaAlaTrpValValGlyIleAsp
41 GlnThrLeuValAspIleGluAlaLysValAspAspGluPheIleGluArgTyrGlyLeu
61 SerAlaGlyHisSerLeuValIleGluAspAspValAlaGluAlaLeuTyrGlnGluLeu
81 LysGlnLysAsnLeuIleThrHisGlnPheAlaGlyGlyThrIleGlyAsnThrMetHis
101 AsnTyrSerValLeuAlaAspAspArgSerValLeuLeuGlyValMetCysSerAsnIle
121 GluIleGlySerTyrAlaTyrArgTyrLeuCysAsnThrSerSerArgThrAspLeuAsn
141 TyrLeuGlnGlyValAspGlyProIleGlyArgCysPheThrLeuIleGlyGluSerGly
161 GluArgThrPheAlaIleSerProGlyHisMetAsnGlnLeuArgAlaGluSerIlePro
181 GluAspValIleAlaGlyAlaSerAlaLeuValLeuThrSerTyrLeuValArgCysLys
201 ProGlyGluProMetProGluAlaThrMetLysAlaIleGluTyrAlaLysLysTyrAsn
221 ValProValValLeuThrLeuGlyThrLysPheValIleAlaGluAsnProGlnTrpTrp
241 GlnGlnPheLeuLysAspHisValSerIleLeuAlaMetAsnGluAspGluAlaGluAla
261 LeuThrGlyGluSerAspProLeuLeuAlaSerAspLysAlaLeuAspTrpValAspLeu
281 ValLeuCysThrAlaGlyProIleGlyLeuTyrMetAlaGlyPheThrGluAspGluAla
301 LysArgLysThrGlnHisProLeuLeuProGlyAlaIleAlaGluPheAsnGlnTyrGlu
321 PheSerArgAlaMetArgHisLysAspCysGlnAsnProLeuArgValTyrSerHisIle
341 AlaProTyrMetGlyGlyProGluLysIleMetAsnThrAsnGlyAlaGlyAspGlyAla
361 LeuAlaAlaLeuLeuHisAspIleThrAlaAsnSerTyrHisArgSerAsnValProAsn
381 SerSerLysHisLysPheThrTrpLeuThrTyrSerSerLeuAlaGlnValCysLysTyr
401 AlaAsnArgValSerTyrGlnValLeuAsnGlnHisSerProArgLeuThrArgGlyLeu
421 ProGluArgGluAspSerLeuGluGluSerTyrTrpAspArg

15

第 5 表

1 ATGAAATTTC CCGGTAAACG TAAATCCAAA CATTACTTCC CCGTAAACGC
51 ACGCGATCCG CTGCTTCAGC AATTCCAGCC AGAAAACGAA ACCAGCGCTG
101 CCTGGGTAGT GGGTATCGAT CAAACGCTGG TCGATATTGA AGCGAAAGTG
151 GATGATGAAT TTATTGAGCG TTATGGATTA AGCGCCGGGC ATTCACTGGT
201 GATTGAGGAT GATGTAGCCG AAGCGCTTTA TCAGGAATA AAACAGAAAA
251 ACCTGATTAC CCATCAGTTT GCGGGTGGCA CCATTGGTAA CACCATGCAC
301 AACTACTCGG TGCTCGCGGA CGACCGTTCTG GTGCTGCTGG GCGTCATGTG
351 CAGCAATATT GAAATTGGCA GTTATGCCTA TCGTTACCTG TGTAACACTT
401 CCAGCCGTAC CGATCTTAAC TATCTACAAG GCGTGGATGG CCCGATTGGT
451 CGTTGCTTTA CGCTGATTGG CGAGTCCGGG GAACGTACCT TTGCTATCAG
501 TCCAGGCCAC ATGAACCAGC TGCGGGCTGA AAGCATTCCG GAAGATGTGA
551 TTGCCGGAGC CTCGGCACTG GTTCTCACCT CATATCTGGT GCGTTGCAAG
601 CCGGGTGAAC CCATGCCGGA AGCAACCATG AAAGCCATTG AGTACGCGAA
651 GAAATATAAC GTACCGGTGG TGCTGACGCT GGGCACCAAG TTTGTCAATG
701 CCGAGAATCC GCAGTGGTGG CAGCAATTCC TCAAAGATCA CGTCTCTATC
751 CTTGCGATGA ACGAAGATGA AGCCGAAGCG TTGACCGGAG AAAGCGATCC
801 GTTGTTGGCA TCTGACAAGG CGCTGGACTG GGTAGATCTG GTGCTGTGCA
851 CCGCCGGGCC AATCGGCTTG TATATGGCGG GCTTTACCGA AGACGAAGCG
901 AAACGTAAAA CCCAGCATCC GCTGCTGCCG GGCGCTATAG CGGAATTCAA
951 CCAGTATGAG TTTAGCCGCG CCATGCGCCA CAAGGATTGC CAGAATCCGC
1001 TCGGTGTATA TTCGCACATT GCGCCGTACA TGGGCGGGCC GGAAAAAATC
1051 ATGAACACTA ATGGAGCGGG GGATGGCGCA TTGGCAGCGT TGCTGCATGA
1101 CATTACCGCC AACAGCTACC ATCGTAGCAA CGTACCAAAC TCCAGCAAAC
1151 ATAAATTCAC CTGGTTAACT TATTCATCGT TAGCGCAGGT GTGTAAATAT
1201 GCTAACCGTG TGAGCTATCA GGTACTGAAC CAGCATTCAC CTCGTTTAAAC
1251 GCGCGGCTTG CCGGAGCGTG AAGACAGCCT GGAAGAGTCT TACTGGGATC
1301 GT

本酵素のN末端アミノ酸配列10個をアプライドバイオシステム社のアミノ酸シーケンサーを用い決定したところ、第5表の塩基配列より予想されるアミノ酸配列（第4表）と一致した。本酵素の第一アミノ酸のメチオニンは切り取られていない。またリジルエンドペプチダーゼで本酵素を分解したペプチド群からC末端ペプチドを分離取得し、そのC末端ペプチドのアミノ酸配列を、先と同様の方法で決定したところ、第4表に示したC末端アミノ酸配列と一致した。以上のことから本酵素のアミノ酸配列は、第5表に示した塩基配列から予想されるアミノ酸配列（第4表）と一致している。

(1) 分子量

アミノ酸配列より予想される分子量は約48400ダルトン、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法（バイオラッド社製、低分子量用スタンダード、カタログ番号161-0304を使用）による測定では約43000ダルトンである。

第5表で表される塩基配列は、第4表で表されるアミノ酸配列で表されるイノシングアノシンキナーゼに対応するものであるが、イノシングアノシンキナーゼ活性を失活しない限りは、該塩基配列を改変して得られる遺伝子を組み込んだ組換え体DNAを保有する菌株を、イノシングアノシンキナーゼ活性を高めた菌株として同様に用いることができる。たとえば、該塩基配列中1282番目のG以降を第6表のように変更して生産した変異酵素においてもイノシングアノシンキナーゼ活性は発現される。

17

第 6 表



つぎに、ヌクレオシド類と A T P または d A T P とから 5'-ヌクレオチド類を生成する反応を触媒する酵素活性を有する酵素源を用いる 5'-ヌクレオチド類の製造法について記載する。

ヌクレオシド類と A T P または d A T P とから 5'-ヌクレオチド類を生成する反応を触媒する酵素活性を有する酵素源の存在下、水性媒体中でヌクレオシド類と A T P または d A T P とを接触させることにより、5'-ヌクレオチド類を得ることができる。

ヌクレオシド類としては、イノシンまたはグアノシンをあげることができる。5'-ヌクレオチド類としては、5'-I M P または 5'-G M P をあげることができる。

酵素源として、イノシングアノシンキナーゼ、該酵素を生産する能力を有する菌体、ヌクレオシド類と A T P または d A T P とから 5'-ヌクレオチド類を生成する反応を触媒する酵素をコードする遺伝子を含む D N A 断片をベクターに組み込んで得られる組換え体 D N A を保有する菌体、それらの培養液またはそれらの処理物などを用いることができる。

処理物としては、培養物の濃縮物、乾燥物、界面活性剤および／ま

たは有機溶剤処理物もしくは溶菌酵素処理物、さらに培養物を遠心分離して得られる菌体、菌体の乾燥物、アセトン処理物、界面活性剤および／または有機溶剤処理物、溶菌酵素処理物、固定化菌体、あるいは菌体からの抽出酵素標品などがあげられる。

反応に用いられるイノシン、グアノシンは、精製品、粗精製品、発酵液もしくは除菌体上清液など、5'-ヌクレオチド類の生成反応を妨げないものであればいずれでも用いることができる。ヌクレオシド類の濃度は、 $10 \sim 80 \text{ g/l}$ の範囲で用いられる。

リン酸基供与体としては、ATPまたはdATPがあげられる。ATPまたはdATPとしては、精製品でも粗精製品でも、ATPまたはdATP含有物であって、反応を阻害するものを含まないものであればいずれでも用いることができる。

ATPおよびdATPは高価であるため、ATP再生活性を有する微生物（特開昭61-74595）を反応系に加え、グルコースと無機リン酸とからATPを合成供給することは有益である。

その場合には、ATPの代わりにATP前駆体、ATP再生エネルギー供与体、リン酸基供与体およびATP生合成活性を有する微生物を反応液中に存在させる。ATP生合成系との共役反応系を用いる場合には、触媒量（ 1.0 g/l 以下）のATPで十分であり、菌体や培養液から反応系中に持ち込まれる量によって必要量が満たされる場合には、特にATPを添加する必要はない。ATP再生活性を有する菌株としては、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネスKY13761株〔アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリィ (Agric. Biol. Chem.), 42, 399 ~ 405 (1978)〕、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネスATCC 21477株などがあげられる。

ブレビバクテリウム・アンモニアゲネスKY13761株は、イノシンを発酵生産するのでこのKY13761株を用いたイノシン発酵液（菌体を含む）をヌクレオシド源かつATP再生活性源として利

用すれば、イノシン精製の手順を踏まずに、発酵液中のイノシンを直接リン酸化でき、より安価で合理的な5'-IMPの製造方法を提供できる。

イノシンまたはグアノシンとATPまたはdATPとから、5'-ヌクレオチド類を生成させる反応は、好ましくは界面活性剤および／または有機溶剤などを添加し、pH 6～8に調整しつつ、かつ温度20～40℃に保ち1～48時間おこなわれる。菌体処理および反応において用いられる界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・ステアリルアミン（例えばナイミンS-215、日本油脂社製；以下特記しない限り同社製のものを使用）、セチルトリメチルアンモニウム・ブロマイド、カチオンFB、カチオンF2-40Eなどのカチオン性界面活性剤、ナトリウムオレイルアミド硫酸、ニューレックスTAB、ラピゾール80などのアニオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンソルビタン・モノステアレート（例えばノニオンST221）などの両性界面活性剤、その他三級アミンPB、ヘキサデシルジメチルアミンなど、ヌクレオシド類とATPまたはdATPとから5'-ヌクレオチド類を生成する反応を促進するものであればいずれでも使用できる。これらは通常0.1～50 mg/ml、好ましくは1～20 mg/mlの濃度で用いられる。

また、有機溶剤としては、トルエン、キシレン、脂肪族アルコール、ベンゼン、酢酸エチルなどが用いられる。通常、0.1～50 μ l/ml、好ましくは1～20 μ l/mlの濃度で用いられる。

反応終了後、反応液中に生成蓄積した5'-ヌクレオチド類を採取するには、イオン交換樹脂などを用いる通常の方法で行う。

図面の簡単な説明

第1図は、イノシングアノシンキナーゼの基質特異性に関するもので縦軸は5'-IMPの生成量、横軸は時間を表わす。

第2図は、イノシングアノシンキナーゼのKCl依存性に関するも

ので、縦軸は5'-IMPの生成量、横軸はKClの添加量を表わす。

第3図は、エッシェリヒア・コリHM70株由来のイノシングアノシンキナーゼをコードする遺伝子を含むプラスミドpBM2の制限酵素地図である。

第4図は、イノシングアノシンキナーゼ構造遺伝子の5'-末端まで欠失の進んだ変異体プラスミドpBMΔ14の制限酵素地図である。

第5図は、イノシングアノシンキナーゼ構造遺伝子の3'-末端まで欠失の進んだ変異体プラスミドpBMM5の制限酵素地図である。

第6図は、ベクターpTrS30の制限酵素地図である。

第7図は、イノシングアノシンキナーゼを高発現するプラスミドpIK75の制限酵素地図である。

第8図は、トリプトファンプロモーターとイノシングアノシンキナーゼ構造遺伝子との接続部の塩基配列を示している。

第9図は、エッシェリヒア・コリW3110株由来のイノシングアノシンキナーゼをコードする遺伝子を含むプラスミドpBM1の制限酵素地図である。

発明を実施するための最良の形態

以下の実施例中、遺伝子工学的実験に用いた試薬およびベクターは全て宝酒造社製のものをを用いた。その他の試薬は半井テスク社製のものをを用いた。

実施例1.

(1) DNAの単離

エッシェリヒア・コリHM70株を、LB液体培地〔1%トリプトン、0.5%酵母エキス、1%塩化ナトリウム(pH7.5)〕に接種し、37℃にて1晩培養した。この培養菌体15gを2mMEDTAを含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)120mlに懸濁し、リゾチーム溶液(リゾチームを20mg/mlの割合で、2mMEDTAを含む20mMトリス塩酸緩衝液に溶解したもの)15mlを加え、30℃で1時間放

置した。これに20%ラウリル硫酸ナトリウム溶液を15 ml加え、よく攪拌した。次にこの溶液に1 mM EDTAを含む10 mMトリス塩酸緩衝液を飽和したフェノール150 mlを加え、十分に攪拌した。この溶液を遠心分離にかけ、水層150 mlを分取した。このようなフェノール抽出の操作を3回繰り返した。得られた水層150 mlに2.5 M酢酸ナトリウム溶液15 mlを加え、さらにエタノール300 mlを加えた。析出した染色体DNAをガラス棒にて巻取り、乾燥させた。次いで、これを1 mM EDTAを含む10 mMトリス塩酸緩衝液30 mlに溶解させ、リボヌクレアーゼを50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように加え、37℃で30分間放置した。前述と同様のフェノール抽出操作を行った後、水層に2.5 M酢酸ナトリウム溶液3 mlおよびエタノール60 mlを加えた後、-20℃で16時間放置した。遠心分離し、得られたペレットを70%エタノール溶液で洗浄し、乾燥させ精製染色体DNAを得た。これを1 mM EDTAを含む10 mMトリス塩酸緩衝液に懸濁した。

(2) 組換え体DNAの調製

第(1)項で得られた染色体DNA 1 μg を含む懸濁液にSau3AIを加えて部分消化を行った。別にベクターpUC19 1 μg を含む溶液20 μl にBamHIを加えて消化を行った後、2 μl の1 Mトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)を加え、アルカリフォスファターゼ処理を65℃で1時間行った。消化された上記染色体DNAおよびベクターDNAを第(1)項と同じ方法によりフェノール抽出およびエタノール沈殿操作により精製した。精製染色体DNA 100 ngおよび精製ベクターDNA 20 ngを、66 mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.6)、66 mM塩化マグネシウム、10 mM DTTおよび0.1 mM ATPを含有する溶液に懸濁し、T4リガーゼを10単位添加し、14℃で16時間反応させ、両方のDNAを連結させ組換え体DNAを得た。

(3) 組換え体DNAを導入した大腸菌の調製

エッシェリヒア・コリHM70株をLB液体培地50 mlに植菌し37

で4時間培養した。3000回転で7分間遠心分離して集めた菌を、0℃の50 mM塩化カルシウム溶液20 mlに懸濁し0℃で20分静置した後、先と同様の遠心操作にて集菌し、0℃、50 mMの塩化カルシウム溶液40 mlに懸濁した。その懸濁液と第(2)項で得られた組換え体DNAを含む溶液を混ぜ0℃で10分間静置した。次いで42℃で90秒熱処理した後、この混合液を50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンプシリンおよび5 mMイノシンを含む最少寒天平板培地に塗布した。この平板培地を30℃で48～72時間保温した。

(4) イノシングアノシンキナーゼをコードするDNAの取得

第(3)項で記述した平板培地上に、2～3日で、数個のコロニーが出現した。これらのコロニーを別々にLB液体培地で30℃、1晩培養した。各々の培養液の一部を、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンプシリンおよび5 mMイノシンを含む最少寒天平板培地に塗布し、30℃で36～48時間保温した。2日目によく生育してきた菌株、すなわち、イノシングアノシンキナーゼ遺伝子を含む組換え体DNAを保有する形質転換体を取得した。イノシングアノシンキナーゼ遺伝子を含む組換え体DNAを保有する形質転換体をLB液体培地で30℃、1晩培養し、集菌したのちManiatisらの著書「モレキュラー・クローニング(1982)コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー」に記された方法によりプラスミドDNAを取り出し、その塩基配列をジデオキシ法[Messing, J., メソッド・イン・エンジモロジー(Methods in Enzymology)、101, 20～78(1983)]で決定した。イノシングアノシンキナーゼの構造遺伝子部分の塩基配列は第5表に示すとおりであった。

得られたエッシェリヒア・コリHM70株由来のイノシングアノシンキナーゼをコードする遺伝子を含む組換え体DNAをpBM2と命名した。pBM2の制限酵素地図を第3図に示す。

第3図中、黒い太線で示した部分がエッシェリヒア・コリHM70株由来のイノシングアノシンキナーゼ構造遺伝子であり、遺伝子の転写

は図中C ℓ a I 部位からB g ℓ II 部位方向に行われる。

(5) イノシングアノシンキナーゼ高発現プラスミドの造成および微生物への導入

イノシングアノシンキナーゼの構造遺伝子をエッシェリヒア・コリのトリプトファンプロモーターの下流に接続することにより、イノシングアノシンキナーゼを高発現化させることができる。

第(4)項で得られたプラスミド p B M 2 を、モレキュラー・クローニング (pp. 86~96) に従い精製した。10 μ g の p B M 2 を制限酵素 S m a I (5 単位) および K p n I (5 単位) で完全分解を行った。得られた切断物を E x o III ヌクレアーゼで処理することにより、挿入断片方向のみの欠失変異体を作成し、イノシングアノシンキナーゼ構造遺伝子の 5'-末端まで欠失の進んだ変異体プラスミド p B M Δ 1 4 (第 4 図) を選択した。欠失体作成にはキロシークエンス用デレーションキットを用い添付の説明書に従い使用した。このプラスミド p B M Δ 1 4 を P s t I および X b a I で切断し、上記と同様 E x o III による挿入断片方向の欠失変異体を作成し、イノシングアノシンキナーゼ構造遺伝子の 3'-末端まで欠失の進んだ変異体プラスミド p B M M 5 (第 5 図) を作成した。10 μ g の p B M M 5 を 10 単位の制限酵素 H i n d III で切断した後、DNA ブランディングキットを用い、切断末端を平滑化した。エタノール添加により末端平滑化 DNA を沈殿として回収した後、制限酵素 S a c I で切断した。切断物をアガロースゲル電気泳動法で分離し、イノシングアノシンキナーゼ構造遺伝子を含む断片をゲルから回収した (旭硝子社製 DNA プレップを用いた)。回収した断片をベクター p T r S 3 0 の S a c I - N r u I 部位に挿入し (第 6 図)、プラスミド p I K 1 を得た。10 μ g の p I K 1 を 5 単位の C ℓ a I で切断した (イノシングアノシンキナーゼ構造遺伝子中の C ℓ a I 部位は通常メチレーションにより修飾されているので切断を受けない)。切断物をエタノール添加により沈殿として回収した後、ヌクレアーゼ

BAL 31により両切断末端に欠失を導入した。欠失体をエタノール添加により沈殿として回収した後、ライゲーション処理（ライゲーションキット）をした。その欠失体をMC1000株に形質転換した。得られた形質転換体より種々の欠失体プラスミドを得た。それらプラスミドの中からベクター由来のシャイン・ダルガーノ配列の直下にイノシングアノシンキナーゼ構造遺伝子が接続したプラスミドpIK75（第7図）を選択した。なお、トリプトファンプロモーターとイノシングアノシンキナーゼ構造遺伝子との接続部の塩基配列を第8図に示す。この項で用いた制限酵素による切断等の遺伝子工学的手法は、特に断らない限り、モレキュラー・クローニングに従った。

(6) イノシングアノシンキナーゼ高発現微生物の培養

第(5)項で得られたプラスミドpIK75を導入したMC1000株〔以下、MC1000 (pIK75) と表示する。〕を培養する場合には、高密度培養法〔バイオテクノロジー・アンド・バイオエンジニアリング (Biotechnol. Bioeng.) 17, 227~239 (1975)〕が好適であり、以下のMC1000 (pIK75) 株の培養は高密度培養法によって行った。

MC1000 (pIK75) 株を下記組成からなるシード培地500 mlに植菌し、30℃で16時間培養した。

シード培地組成： KH_2PO_4 3.5 g/l、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 3.5 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/l、グルコース5.0 g/l、酵母エキス5.0 g/l、微量元素液3 ml/l（120℃、30分間煮沸滅菌）。

微量元素液組成： $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 27 g/l、 $\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2 g/l、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2 g/l、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 g/l、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 g/l、 CuCl_2 1 g/l、 H_3BO_3 0.5 g/l、濃 HCl 100 ml/l。

次に、7.5 l容量の発酵槽に3 lの発酵培地（上記組成からなるシード培地3 lにさらに $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 10 gおよび $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5

gを加えて調整した培地)を封入し、120℃で30分間蒸煮滅菌した。50%(w/v)グルコース溶液150mlを滅菌し、発酵槽に添加した後、MC1000(pIK75)株を培養した前記シード培地500mlを添加した。

5.5Mアンモニア水を用いてpH6.8に調整しつつ、攪拌(600rpm)、通気(3ℓ/min)し24時間培養を行った。培養開始後4~6時間で培養液中のグルコース濃度は2.5%以下に低下する。この時点から50%(w/v)グルコース溶液を少量ずつ連続的に発酵槽に添加し、培養液中のグルコース濃度が2~3%であるように保つ。(培養物を遠心し、沈殿として回収した菌体を-20℃で保存し、下記第(7)項目および第(9)項目に用いた。また、培養終了時の培養液を直接-20℃で凍結しておき、実験直前に30℃で融解したものを下記第(10)項目で用いた。)

(7) イノシングアノシンキナーゼの精製

第(6)項で得られた-20℃保存菌体6gを24mlの精製用緩衝液[20%グリセロール、50mMトリス塩酸緩衝液(pH8)および5mMβ-メルカプトエタノール]に懸濁し、ホモゲナイザー(ブラウン・バイオテック社製、ガラスビース径0.1mm)で破碎した。破碎液を遠心し、上清約20mlを得た。上清に、終濃度0.4%になるように硫酸プロタミンを添加した後遠心を行い、高分子核酸成分を沈殿として除去した。得られた上清を、予め精製用緩衝液で平衡化したセファデックスG-50カラムに添加し、精製用緩衝液で溶出し、脱塩活性画分約30mlを得た。この画分を、予め精製用緩衝液で平衡化したDEAEセファロースカラムに添加した後、0.1M NaClを含む精製用緩衝液60mlを添加し、その後0.1M→0.6MのNaCl直線濃度勾配を持つ精製用緩衝液200mlで目的酵素を溶出し、活性溶出画分のうち最も酵素濃度の高い部分3mlを採取した。この活性画分をセファクリルS-200カラムに添加し、0.1M NaClを含む精製用緩衝液で

溶出し、ゲル濾過を行い、活性画分を採取した。最終的に、 $1.4 \mu\text{g}$ 蛋白/ ml の精製酵素を 10 ml 取得した。この精製酵素を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法にて解析したところ、不純物は確認されなかった。本酵素は、 0.1 M NaCl を含む精製用緩衝液中 -20°C で安定に保存される。

(8) ATP 再生活性菌の培養

ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス KY 13761 を、第 7 表に記載の組成からなるシード培地に寒天 25 g/l を加えて調整したシード寒天培地上で、 30°C 、2 日間培養した。得られた菌体を 250 ml 容三角フラスコ中のシード培地 30 ml に植菌し、 30°C 、24 時間振盪培養した。

5 l 容量の発酵槽中のシード培地 3 l に、 30 ml の培養液全量を植菌した。 5.5 M アンモニア水で pH を 6.8 に保ちつつ、 32°C 、攪拌 600 rpm 、通気 3 l/min で 24 時間培養した。

得られた培養液中 300 ml を 5 l 容発酵槽中の第 7 表に記載の組成からなる発酵培地 3 l に植菌した。 5.5 M アンモニア水で pH 6.8 に保ちつつ、 32°C 、攪拌 600 rpm 、通気 3 l/min で 42 時間培養した。〔培養液を遠心し、沈殿として回収した菌体を -20°C で保存し、下記第(9)項目に用いた。また、培養終了時の培養液（イノシンを約 30 g/l 含む）を直接 -20°C で凍結しておき、実験直前に 30°C で融解したものを下記第(10)項目で用いた。〕

27

第 7 表

組 成 (g / ℓ)	シード培地	発酵培地
グルコース	5 0	1 5 0
K H ₂ P O ₄	1	1 0
K ₂ H P O ₄	3	1 0
M g S O ₄ · 7 H ₂ O	1	1 0
C a C ℓ ₂ · 2 H ₂ O	0. 1	0. 1
F e S O ₄ · 7 H ₂ O	0. 0 1	0. 0 1
Z n S O ₄ · 7 H ₂ O	0. 0 0 1	0. 0 0 1
M n S O ₄ · 4 ~ 6 H ₂ O	0. 0 0 4	0. 0 0 4
L - システイン · H C ℓ	0. 0 2	0. 0 2
チ ア ミ ン	0. 0 0 5	0. 0 0 5
C a - D - パントテン酸	0. 0 1	0. 0 1
ニコチン酸	なし	0. 0 0 5
ビオチン	3 0 μg / ℓ	3 0 μg / ℓ
尿 素	5	2
(N H ₄) ₂ S O ₄	5	なし
肉エキス	なし	1 0
ポリペプトン	1 0	なし
イーストエキストラクト	1 0	なし
ア デ ニ ン	0. 3	0. 2
p H	7. 2	8. 3

〔蒸煮滅菌して使用（120℃、30分）〕

(9) 休止菌体反応によるヌクレオシドからの5'-ヌクレオチド生産

第8表に示した反応液組成の溶液20mlを強く攪拌しながら、32℃に保ち、また4N NaOHを用いてpHを7.2に保ちつつ24時間反応を行った。経時的に少量の反応液をサンプリングし、溶液中の

リン酸、イノシン、5'-IMP濃度を測定した。リン酸の定量には、Phospho B-test WAKO（和光純薬社製）を用い、毎回の測定値と初発添加分の差量をリン酸1カリウムを添加することにより補った。またイノシンおよび5'-IMPの濃度は、9頁で述べた方法に準じて、HPLCにより定量した。初発約50g/ℓのイノシンから反応24時間目に約100g/ℓの5'-IMP（2ナトリウム、7.5水和物換算）が生産された。このときのモル転換率は90%以上である。イノシンの代わりにグアノシンを添加しても、同様の経時変化で、モル転換率90%以上の5'-GMP生産が行われる。

第 8 表

反応液組成	
KY13761 株	200 g 湿菌体/ℓ
MC1000(pIK75) 株	20 g 湿菌体/ℓ
イノシン	50 g/ℓ
リン酸1カリウム	20 g/ℓ
グルコース	30 g/ℓ
硫酸マグネシウム	5 g/ℓ
キシレン	10 ml/ℓ
ナイミーンS-215	4 g/ℓ
フィチン酸	5 g/ℓ

(10) イノシン発酵培養液を使用したイノシンからの5'-IMP生産

前記第(8)項によって得られた発酵終了時の培養液には約30g/ℓのイノシンが蓄積していた。この培養液を含む反応液20mlを第9表のように作成し、第(9)項と同様に強く攪拌しながら、32℃に保ち、また4N NaOHを用いてpHを7.2に保ちつつ13時間反応を行った。リン酸1カリウムの途中添加は第(9)項と同様の方法で行った。

初発イノシン 23.5 g / ℓ から 46 g / ℓ の 5'-IMP が生成蓄積した。この場合も第(9)項と同じくモル転換率は 90 % 以上であった。

第 9 表

反応液組成	
イノシン発酵培養液 (KY13761 菌体を含む)	15.7 ml
MC1000(pIK75) 培養液	1.82 ml
リン酸 1 カリウム	0.4 g
グルコース	0.7 g
硫酸マグネシウム	0.1 g
キシレン	0.2 ml
ナイミーン S-215	80 mg
フィチン酸	100 mg

(以上を蒸留水にて 20 ml にする)

実施例 2.

(1) DNA の単離

エッシェリヒア・コリ HM70 株のかわりにエッシェリヒア・コリ W3110 株を用いる以外は実施例 1 の第(1)項と同様の方法で、精製染色体 DNA を得た。これを 1 mM EDTA を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液に懸濁させた。

(2) 組換え体 DNA の調製

実施例 1 第(1)項で得られた懸濁液のかわりに実施例 2 第(1)項で得られた染色体 DNA 1 μg を含む懸濁液を用いる以外は実施例 1 第(2)項と同様の方法で組換え体 DNA を得た。

(3) 組換え体 DNA を導入した大腸菌の調製

エッシェリヒア・コリ DH1 株を LB 液体培地 50 ml に植菌し、3

7℃で4時間培養した。3000回転で7分間遠心分離して集めた菌体を、0℃の50mM塩化カルシウム溶液20mlに懸濁し、0℃で20分静置した後、先と同様の遠心操作にて集菌し、0℃、50mMの塩化カルシウム溶液40mlに懸濁した。その懸濁液と実施例2第(2)項で得られた組換え体DNAを含む溶液を混ぜ、0℃で10分間静置した。42℃で90秒熱処理した後、この混合液を50μg/mlのアンプシリン、0.1mMのイソプロピルチオガラクトサイド (IPTG) および0.004%の5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイル-β-D-ガラクトピラノシドを加えたLB寒天平板培地 (LB液体培地に1.5%寒天を含む) に塗布した。

得られた白色のコロニーを、10ml LB液体培地で30℃、1晩培養し、遠心分離にて菌体を分離した。それら分離菌体は-20℃で保存し、下記に示す方法にて順次イノシングアノシンキナーゼ活性を測定した。

(4) イノシングアノシンキナーゼをコードするDNAの取得

実施例2第(3)項で取得した組換え体DNAを含む大腸菌菌体を、10mM ATP、10mMイノシンおよび5mM硫酸マグネシウムを含む100mMトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で懸濁 (菌体濃度は100g湿菌体/ml) した。懸濁液にキシレンを10ml/lになるように加えよく攪拌した後、30℃で1時間静置した。その反応液をHPLCにて分析し反応液中の5'-IMP量を定量した。ほとんど全ての形質転換株は5'-IMPを生産しなかったが、5万検体に1検体程度の割合で5'-IMPの生産菌が得られた。このようにして得られた5'-IMP生産菌がイノシングアノシンキナーゼ遺伝子を含む組換え体DNAを保有する形質転換株である。

得られた形質転換株をLB液体培地にて30℃、1晩培養し、集菌したのちモレキュラー・クローニングに記された方法によりプラスミドDNAを取出し、その塩基配列をジデオキシ法にて決定した。イノ

シングアノシンキナーゼの構造遺伝子部分の塩基配列は、第5表に示すとおりであった。

得られたエッシェリヒア・コリ W 3 1 1 0 株由来のイノシングアノシンキナーゼをコードする遺伝子を含む組換え体 DNA を p B M 1 と命名した。p B M 1 の制限酵素地図を第9図に示す。

(5) 5'-IMPの製造

実施例2第(4)項で得られた組換え体 DNA p B M 1 を導入した形質転換株エッシェリヒア・コリ H M 1 (FERM BP-2669) を 4 0 0 ml の L B 液体培地 (5 0 μ g/ml アンピシリンを含む) で 3 0 °C、1 6 時間培養した後、遠心分離し菌体を得た。対照として、ベクター p U C 1 9 のみを含有するエッシェリヒア・コリ D H 1 / p U C 1 9 の培養菌体を、前記と同様にして得た。得られた菌体を含む第10表の溶液 2 0 ml を 3 0 °C、1 時間反応させた後、溶液中の 5'-IMP の生成量を H P L C にて定量したところ、5 mg であることが確認された。また、対照のベクター保有株の菌体を用いた場合は、溶液中には 5'-IMP が検出されなかった。

第 1 0 表

反応液組成	
菌 体	100g 湿菌体 / ℓ
イノシン	10mM
A T P	10mM
トリス塩酸緩衝液 (pH8.0)	100mM
硫酸マグネシウム	5mM
キシレン	10ml / ℓ

(6) 5'-GMPの製造

実施例2第(4)項で得られた組換え体 DNA p B M 1 を導入した形質

転換株エッシェリヒア・コリ HM 1 株を、400 ml の LB 液体培地（50 μ g/ml アンピシリンを含む）で 30℃、16 時間培養した後、遠心分離し菌体を得た。対照としてベクター pUC 19 のみを含有するエッシェリヒア・コリ DH 1 / pUC 19 の菌体を前記と同様にし得た。得られた菌体を含む第 11 表の溶液 20 ml を 30℃、1 時間反応させた後、溶液中の 5'-GMP の生成量を HPLC にて定量したところ、2 mg であることが確認された。対照のベクター保有株の菌体を用いた場合は、溶液中には 5'-GMP は検出されなかった。

第 11 表

反応液組成	
菌 体	100g 湿菌体 / ℓ
グアノシン	10mM
ATP	10mM
トリス塩酸緩衝液 (pH8.0)	100mM
硫酸マグネシウム	5mM
キシレン	10ml / ℓ

(7) 遺伝子工学による活性の増強

イノシングアノシンキナーゼ構造遺伝子の上流に SD 配列と強いプロモーター配列を遺伝子工学的に結合することで、イノシングアノシンキナーゼの発現を強化することは、以下のようにして行いうる。

実施例 2 第(4)項で得られたプラスミド pBM 1 を 1 μ g を含む溶液 20 μ l に、10 単位の BamHI、10 単位の SacI および 10 単位の ScaI で完全消化した後、イノシングアノシンキナーゼ構造遺伝子を含む 2.8 Kb 断片をアガロースゲル電気泳動法（モレキュラー・クローニング）を用い単離精製した。精製した断片を BAL 31ヌクレアーゼで 37℃、10 分間消化した後、フェノール抽出、エタノール沈殿を行い、

末端に欠失の起こったDNA断片を得た。一方、ベクターpUC19 1 μ gを含む溶液20 μ lに10単位のSma Iを加え完全消化した後、2 μ lの1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を加え、アルカリフォスファターゼ5単位を加え、65℃で1時間反応を行った。精製したイノシングアノシンキナーゼを含むDNA断片100 ngおよびアルカリフォスファターゼ処理したベクターDNA 20 ngを、66 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6)、66 mM 塩化マグネシウム、10 mM DTTおよび0.1 mM ATPを含有する溶液に懸濁し、T4リガーゼを10単位添加し、14℃で16時間反応させ、両方のDNAを連結させ組換え体DNAを得た。これら組換え体DNAを実施例2第(3)項と同様の方法で、エッシェリヒア・コリDH1株に導入した。得られた形質転換株を実施例2第(3)項と同様の方法で培養し、実施例2第(4)項と同様にしてイノシングアノシンキナーゼ活性を測定し、5'-IMP生産能の高い株を選択し、エッシェリヒア・コリ BM100株と命名した。エッシェリヒア・コリBM100株の有する組換え体プラスミドは、イノシングアノシンキナーゼ構造遺伝子上流にラクトースプロモーター配列が順方向に接続したものであった。

(8) 5'-IMPの製造

エッシェリヒア・コリBM100株を、400 mlのLB液体培地 (50 μ g/mlアンピシリンを含む) で30℃、16時間培養した後、遠心分離し菌体を得た。得られた菌体およびATP再生活性を保有する菌株 (特開昭61-74595) を含む第12表の溶液20 mlを30℃、pH 7.6にて20時間反応させた後、溶液中の5'-IMPの生成量をHPLCにて定量したところ、25 g/l (水和物換算) であることが確認された。またこのとき、C末端から8番目のLeu以降のアミノ酸配列がGlyMetGlnAlaGlyThrGluLeuGluPheThrGlyArgArgPheThrThrSerになるように用いる構造遺伝子の一部を改変したDNAを用いて作製した組換え体DNA保有株を用いた場合でも、同様の力価をあげることができ

た。

第 12 表

反応液組成	
ブレビバクテリウム・ アンモニアゲネス菌体 (ATP再生菌、ATCC21477)	200g湿菌体 / ℓ
イノシングアノシンキナーゼ強化大腸菌	25g湿菌体 / ℓ
イノシン	12.5 g / ℓ
リン酸1カリウム	20 g / ℓ
グルコース	50 g / ℓ
硫酸マグネシウム	5 g / ℓ
キシレン	10 ml / ℓ

産業上の利用可能性

本発明によって、エッシュェリヒア属に属する微生物由来のイノシングアノシンキナーゼを提供することができ、しかも該酵素の諸性質が初めて明らかになったことにより、その工業的利用への道が開けた。また該酵素をコードするDNAが単離され、このDNAをベクターに組み込んだ組換え体DNAを含む微生物を触媒として、温和な条件下でヌクレオシド類、例えばイノシンまたはグアノシンから5'-ヌクレオチド類、例えば5'-IMPまたは5'-GMPの生産を高い転換率でおこなうことができる。

請 求 の 範 囲

(1) 下記の理化学的性質を有するイノシングアノシンキナーゼ

① 作 用

アデノシン三リン酸 (ATP) とイノシンからアデノシン二リン酸 (ADP) と5'-イノシン酸 (5'-IMP) を生成する作用、デオキシアデノシン三リン酸 (dATP) とイノシンからデオキシアデノシン二リン酸 (dADP) と5'-IMP を生成する作用、ATP とグアノシンからADP と5'-グアニル酸 (5'-GMP) を生成する作用およびdATP とグアノシンからdADP と5'-GMP を生成する作用を併有する。

② 至適 pH

6.9 ~ 8.2

③ pH 安定性

4℃、16時間の処理でpH 6.6 ~ 9.0の範囲で安定に保たれる。またKClの添加は保存安定性を促進する。

④ 至適温度

25 ~ 40℃

⑤ 温度安定性

pH 7.2、15分間の処理で40℃まで安定

⑥ 基質特異性

イノシン、グアノシンへのリン酸基供与基質としてはATPまたはdATPのγ位のリン酸が利用される。

⑦ 阻害剤

Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} の金属イオン

⑧ 活性化

K^{+} と Mg^{2+} または K^{+} と Mn^{2+} のいずれかの組合わせのイオン群を要求する。

⑨ K_m 値

2 mM ATP、10 mM $MgSO_4$ 、300 mM KCl、0.1 M HEPES 緩衝液 (pH 7.2) の組成からなる反応液中での K_m 値は、イノシンに対して 2.1 mM、グアノシンに対して 6.1 μ M

⑩ 分子量

アミノ酸配列より予想される分子量は約 48400 ダルトン、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法による測定では約 43000 ダルトンである。

- (2) 下記に示されるアミノ酸配列で表わされるポリペプチドであることを特徴とする請求項(1)記載のイノシングアノシンキナーゼ。

1 MetLysPheProGlyLysArgLysSerLysHisTyrPheProValAsnAlaArgAspPro
21 LeuLeuGlnGlnPheGlnProGluAsnGluThrSerAlaAlaTrpValValGlyIleAsp
41 GlnThrLeuValAspIleGluAlaLysValAspAspGluPheIleGluArgTyrGlyLeu
61 SerAlaGlyHisSerLeuValIleGluAspAspValAlaGluAlaLeuTyrGlnGluLeu
81 LysGlnLysAsnLeuIleThrHisGlnPheAlaGlyGlyThrIleGlyAsnThrMetHis
101 AsnTyrSerValLeuAlaAspAspArgSerValLeuLeuGlyValMetCysSerAsnIle
121 GluIleGlySerTyrAlaTyrArgTyrLeuCysAsnThrSerSerArgThrAspLeuAsn
141 TyrLeuGlnGlyValAspGlyProIleGlyArgCysPheThrLeuIleGlyGluSerGly
161 GluArgThrPheAlaIleSerProGlyHisMetAsnGlnLeuArgAlaGluSerIlePro
181 GluAspValIleAlaGlyAlaSerAlaLeuValLeuThrSerTyrLeuValArgCysLys
201 ProGlyGluProMetProGluAlaThrMetLysAlaIleGluTyrAlaLysLysTyrAsn
221 ValProValValLeuThrLeuGlyThrLysPheValIleAlaGluAsnProGlnTrpTrp
241 GlnGlnPheLeuLysAspHisValSerIleLeuAlaMetAsnGluAspGluAlaGluAla
261 LeuThrGlyGluSerAspProLeuLeuAlaSerAspLysAlaLeuAspTrpValAspLeu
281 ValLeuCysThrAlaGlyProIleGlyLeuTyrMetAlaGlyPheThrGluAspGluAla
301 LysArgLysThrGlnHisProLeuLeuProGlyAlaIleAlaGluPheAsnGlnTyrGlu
321 PheSerArgAlaMetArgHisLysAspCysGlnAsnProLeuArgValTyrSerHisIle
341 AlaProTyrMetGlyGlyProGluLysIleMetAsnThrAsnGlyAlaGlyAspGlyAla
361 LeuAlaAlaLeuLeuHisAspIleThrAlaAsnSerTyrHisArgSerAsnValProAsn
381 SerSerLysHisLysPheThrTrpLeuThrTyrSerSerLeuAlaGlnValCysLysTyr
401 AlaAsnArgValSerTyrGlnValLeuAsnGlnHisSerProArgLeuThrArgGlyLeu
421 ProGluArgGluAspSerLeuGluGluSerTyrTrpAspArg

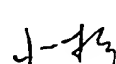
- (3) イノシンまたはグアノシンと A T P または d A T P とから 5' - I M P または 5' - G M P を生成する反応を触媒する酵素をコードする遺伝子。
- (4) 遺伝子が、請求項(2)記載のイノシングアノシンキナーゼをコードする遺伝子である請求項(3)記載の遺伝子。
- (5) 遺伝子が、下記に示される塩基配列で表わされる遺伝子である請求項(3)記載の遺伝子。

1 ATGAAATTTC CCGGTAAACG TAAATCCAAA CATTACTTCC CCGTAAACGC
51 ACGCGATCCG CTGCTTCAGC AATTCCAGCC AGAAAACGAA ACCAGCGCTG
101 CCTGGGTAGT GGGTATCGAT CAAACGCTGG TCGATATTGA AGCGAAAGTG
151 GATGATGAAT TTATTGAGCG TTATGGATTA AGCGCCGGGC ATTCACTGGT
201 GATTGAGGAT GATGTAGCCG AAGCGCTTTA TCAGGAACTA AAACAGAAAA
251 ACCTGATTAC CCATCAGTTT GCGGGTGGCA CCATTGGTAA CACCATGCAC
301 AACTACTCGG TGCTCGCGGA CGACCGTTCTG GTGCTGCTGG GCGTCATGTG
351 CAGCAATATT GAAATTGGCA GTTATGCCTA TCGTTACCTG TGTAACACTT
401 CCAGCCGTAC CGATCTTAAC TATCTACAAG GCGTGGATGG CCCGATTGGT
451 CGTTGCTTTA CGCTGATTGG CGAGTCCGGG GAACGTACCT TTGCTATCAG
501 TCCAGGCCAC ATGAACCAGC TGCGGGCTGA AAGCATTCCG GAAGATGTGA
551 TTGCCGGAGC CTCGGCACTG GTTCTCACCT CATATCTGGT GCGTTGCAAG
601 CCGGGTGAAC CCATGCCGGA AGCAACCATG AAAGCCATTG AGTACGCGAA
651 GAAATATAAC GTACCGGTGG TGCTGACGCT GGGCACCAAG TTTGTCATTG
701 CCGAGAATCC GCAGTGGTGG CAGCAATTCC TCAAAGATCA CGTCTCTATC
751 CTTGCGATGA ACGAAGATGA AGCCGAAGCG TTGACCGGAG AAAGCGATCC
801 GTTGTTGGCA TCTGACAAGG CGCTGGACTG GGTAGATCTG GTGCTGTGCA
851 CCGCCGGGCC AATCGGCTTG TATATGGCGG GCTTTACCGA AGACGAAGCG
901 AAACGTAAAA CCCAGCATCC GCTGCTGCCG GCGCTATAG CGGAATTCAA
951 CCAGTATGAG TTTAGCCGCG CCATGCGCCA CAAGGATTGC CAGAATCCGC
1001 TGCGTGTATA TTCGCACATT GCGCCGTACA TGGGCGGGCC GGAAAAAATC
1051 ATGAACACTA ATGGAGCGGG GGATGGCGCA TTGGCAGCGT TGCTGCATGA
1101 CATTACCGCC AACAGCTACC ATCGTAGCAA CGTACCAAAC TCCAGCAAAC
1151 ATAAATTAC CTGGTTAACT TATTCATCGT TAGCGCAGGT GTGTAAATAT
1201 GCTAACCGTG TGAGCTATCA GGTACTGAAC CAGCATTAC CTGTTTTAAC
1251 GCGCGGCTTG CCGGAGCGTG AAGACAGCCT GGAAGAGTCT TACTGGGATC
1301 GT

- (6) 遺伝子が、大腸菌由来である請求項(3)、(4)または(5)記載の遺伝子。
- (7) 請求項(3)～(5)から選ばれる請求項記載の遺伝子を含むDNA断片をベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。
- (8) 請求項(7)記載の組換え体DNAを保有する微生物。
- (9) 微生物が、大腸菌である請求項(8)の記載の微生物。
- (10) エッシェリヒア属に属し、イノシングアノシンキナーゼを生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養物中にイノシングアノシンキナーゼを生成蓄積させ、該培養物からイノシングアノシンキナーゼを採取することを特徴とするイノシングアノシンキナーゼの製造法。
- (11) 微生物が、請求項(8)記載の微生物である請求項(10)記載のイノシングアノシンキナーゼの製造法。
- (12) イノシンまたはグアノシンとATPまたはdATPとから5'-IMPまたは5'-GMPを生成する反応を触媒する酵素活性を有する酵素源の存在下、水性媒体中でイノシンまたはグアノシンとリン酸基供与体とを反応させて、反応液中に5'-IMPまたは5'-GMPを生成蓄積させ、該反応液から5'-IMPまたは5'-GMPを採取することを特徴とする5'-IMPまたは5'-GMPの製造法。
- (13) リン酸基供与体が、ATPまたはdATPである請求項(12)記載の5'-IMPまたは5'-GMPの製造法。
- (14) 酵素源が、イノシングアノシンキナーゼである請求項(12)記載の5'-IMPまたは5'-GMPの製造法。
- (15) 酵素源が、イノシンまたはグアノシンとATPまたはdATPとから5'-IMPまたは5'-GMPを生成する活性を有する微生物の菌体、培養液またはその処理物である請求項(12)記載の5'-IMPまたは5'-GMPの製造法。
- (16) 微生物が、エッシェリヒア属に属する微生物である請求項(15)記載の5'-IMPまたは5'-GMPの製造法。

- 07) 微生物が、請求項(8)記載の微生物である請求項05)または06)記載の
5'-IMPまたは5'-GMPの製造法。

国際出願番号 PCT/JP 90 1 01567.

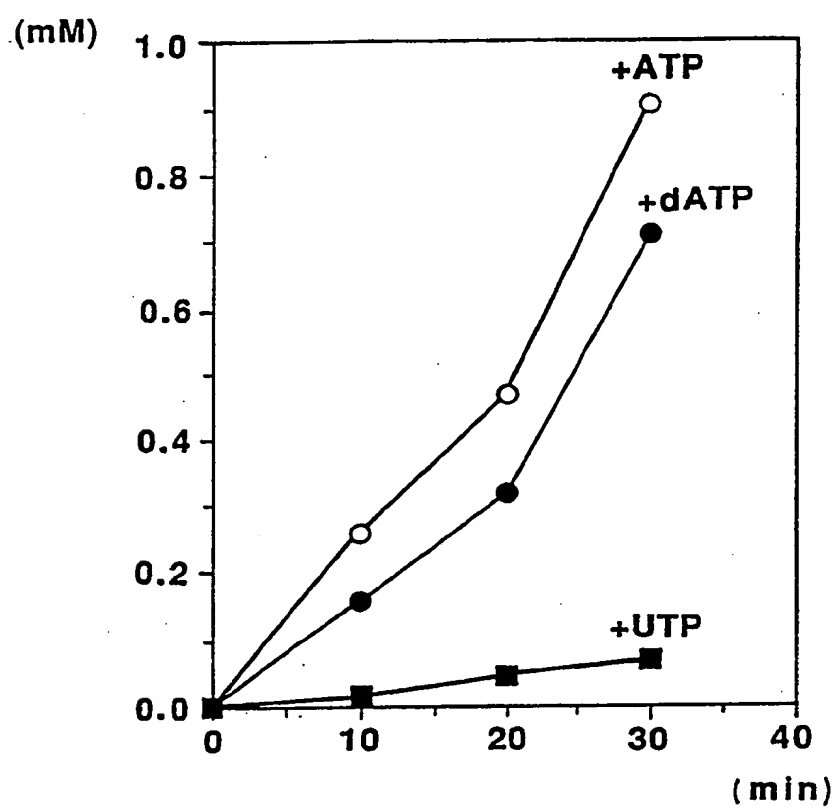
微 生 物	
明細書の 7 又 12 行目に示した微生物に関する任意用法	
A. 寄託の特定 該の寄託が特許に記述されている。 <input type="checkbox"/>	
寄託機関の名称 <p style="text-align: center;">通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所</p>	
寄託機関の所在地 (郵便番号及び国を記す) <p style="text-align: center;">日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号305)</p>	
寄託日 <p style="text-align: center;">06.10.90</p>	登録番号 <p style="text-align: center;">FERM BP-3125</p>
B. 追加記載 (必要ない場合には空白にしておく) この記載は特許請求に記載されている。 <input type="checkbox"/>	
<p>ヨーロッパ特許が求められているそれぞれの指定国については、寄託微生物の標本の分譲は欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、又は欧州特許出願が拒絶され、取下げられ若しくは取下げられたとみなされる日まで標本の請求人により指名された専門家に分譲することによってのみ可能である (Rule 28(4) EPC)。</p>	
C. この記載が目的とする指定国 (すべての指定国を目的としないとき)	
D. 別個の表示の届出 (必要ない場合には空白にしておく)	
下記の表示は特許に国際事務局に提出する予定である。 (例えば「登録番号」のように表示事項を規定する)	
E. <input checked="" type="checkbox"/> この局本は国際出願と共に出願時に登録された。 (登録官庁が決定する)	
<div style="text-align: right;">  K. Komatsu (署名のある局本) </div>	
<input type="checkbox"/> 国際事務局が (出願人から) 登録した日	
<div style="text-align: right;"> _____ (署名のある局本) </div>	

国際出願番号 PCT/JP 90 1 01567.

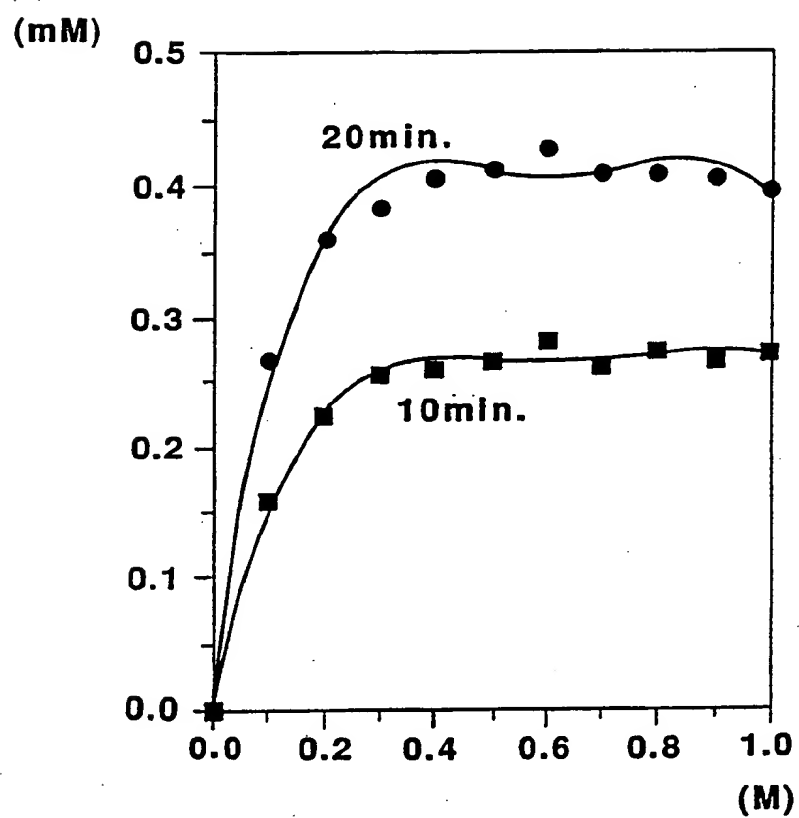
微 生 物	
本出願の 7 頁 14 行目に基づいた微生物に関する特許請求	
A. 寄託の特定 該の寄託が特許に記載されている。 <input type="checkbox"/>	
寄託機関の名称 <p style="text-align: center;">通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所</p>	
寄託機関の住所（郵便番号及び国を含む） <p style="text-align: center;">日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）</p>	
寄託日 <p style="text-align: center;">01.12.89</p>	登録番号 <p style="text-align: center;">FERM BP-2669</p>
B. 追加記号 （該当しない場合には空白にしておく）この特許は特許料に納めている。 <input type="checkbox"/>	
<p>ヨーロッパ特許が求められているそれぞれの指定国については、寄託微生物の標本の分譲は欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、又は欧州特許出願が拒絶され、取下げられ若しくは取下げられたとみなされる日まで標本の請求人により指名された専門家に分譲することによってのみ可能である（Rule 28(4) EPC）。</p>	
C. この記号が目的とする指定国 （すべての指定国を目的としないとき）	
D. 別個の表示の届出 （該当しない場合には空白にしておく）	
下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「登録番号」のように表示事項を明記する）	
E. <input checked="" type="checkbox"/> V この特許は国際出願と共に出願時に登録された。（登録官庁が選択する）	
<div style="text-align: right;"> <div style="display: inline-block; text-align: center;"> <div style="font-size: 1.5em;">1-13</div> <div style="font-size: 0.8em;">(署名のある氏名)</div> </div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="font-size: 1.2em;">k.komatsu</div> <div style="font-size: 0.8em;">(署名のある氏名)</div> </div> </div>	
<input type="checkbox"/> 国際事務局が（出願人から）登録した日	
<div style="text-align: right;"> <div style="font-size: 0.8em;">(署名のある氏名)</div> </div>	

1/8

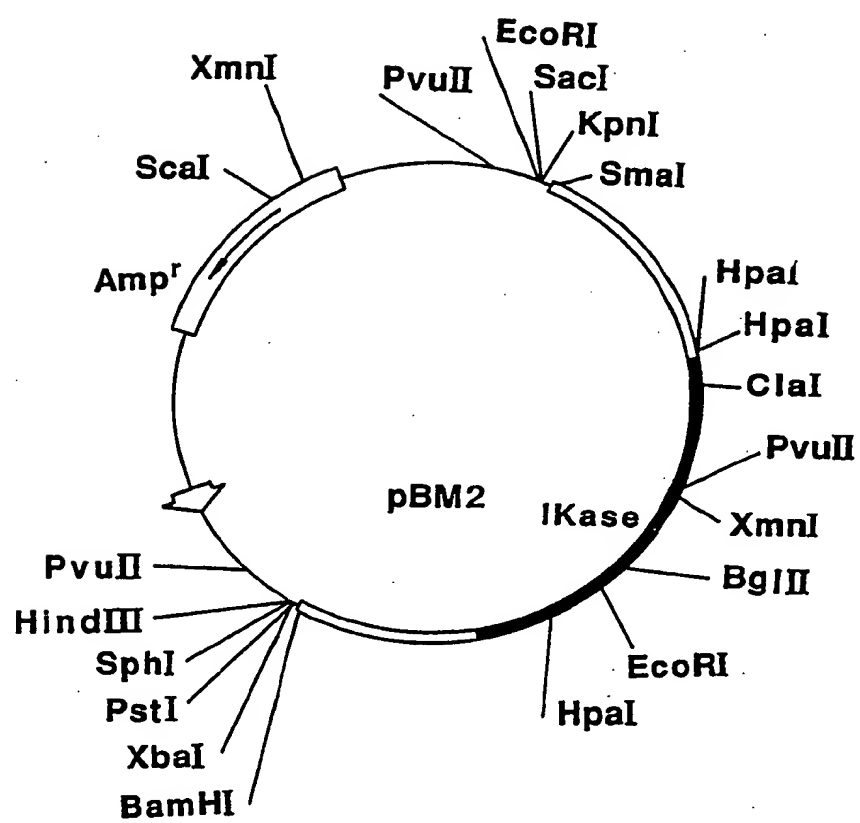
第 1 図



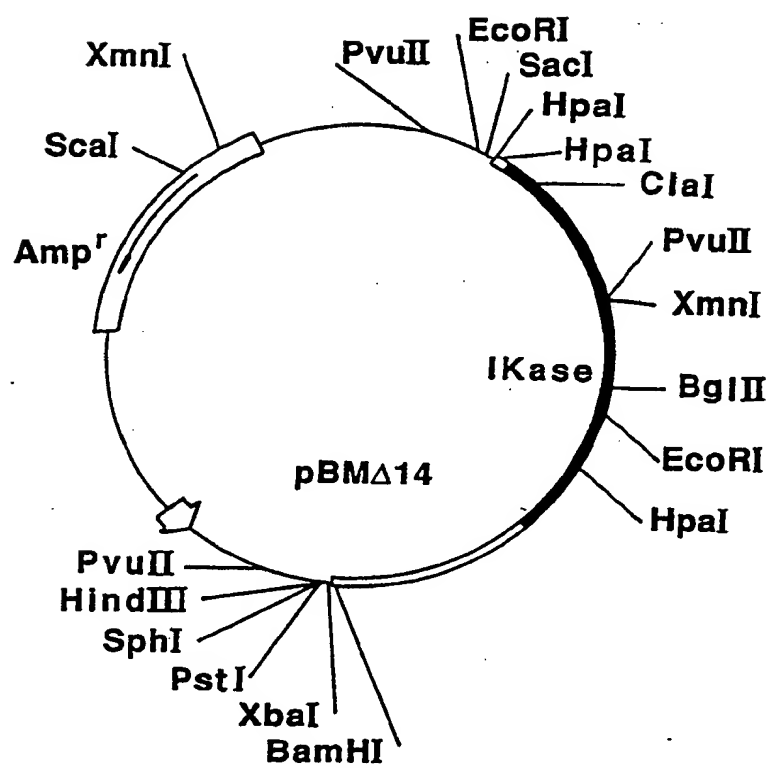
第 2 図



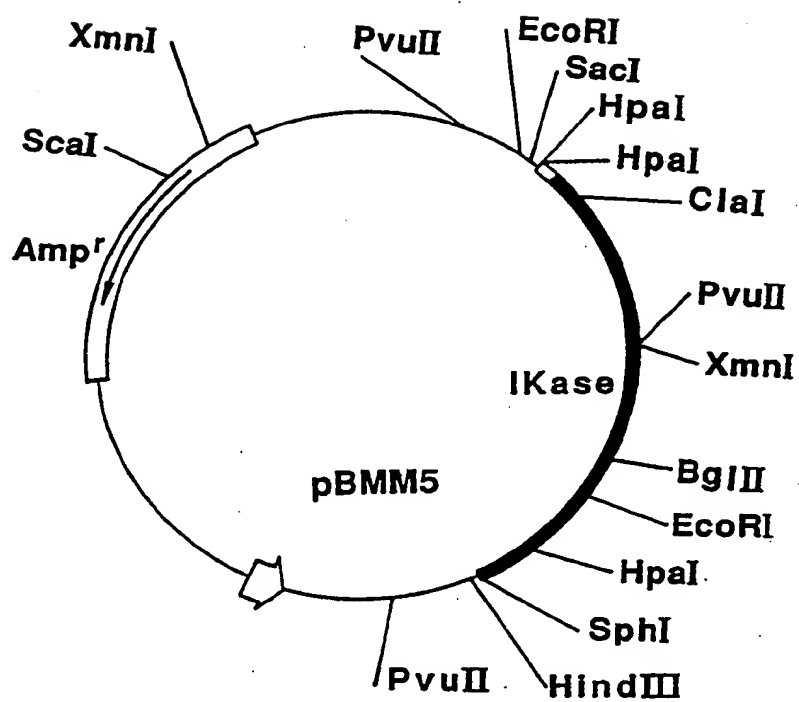
第 3 図



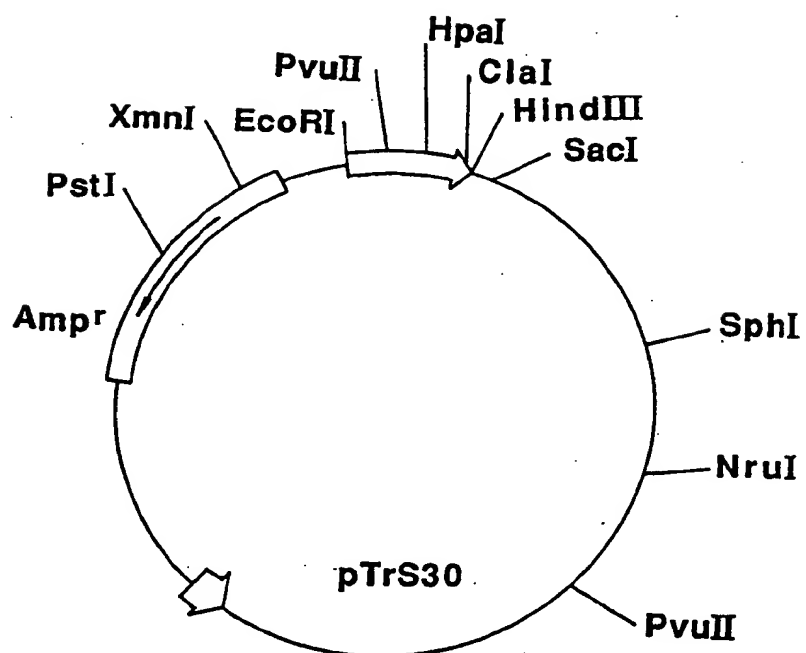
第 4 図



第 5 図

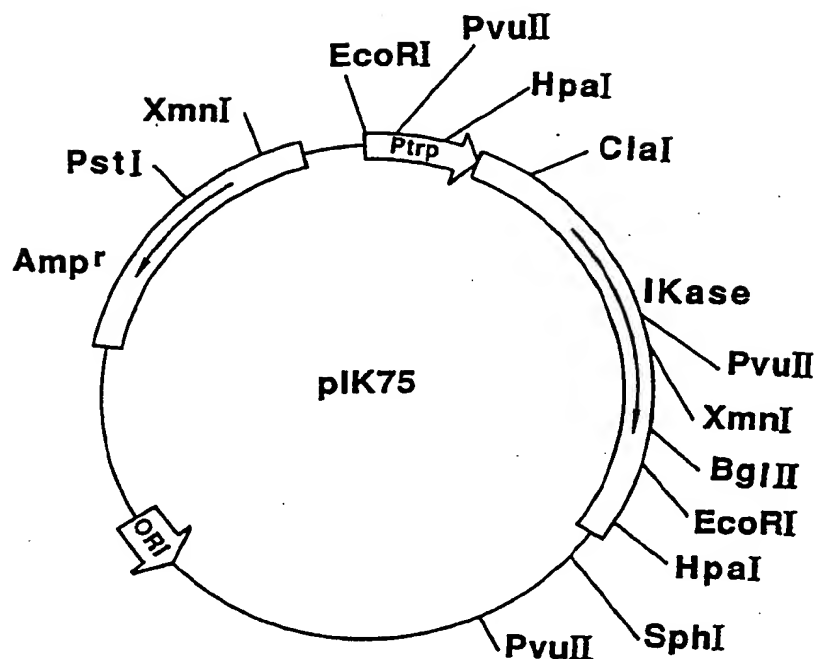


第 6 図

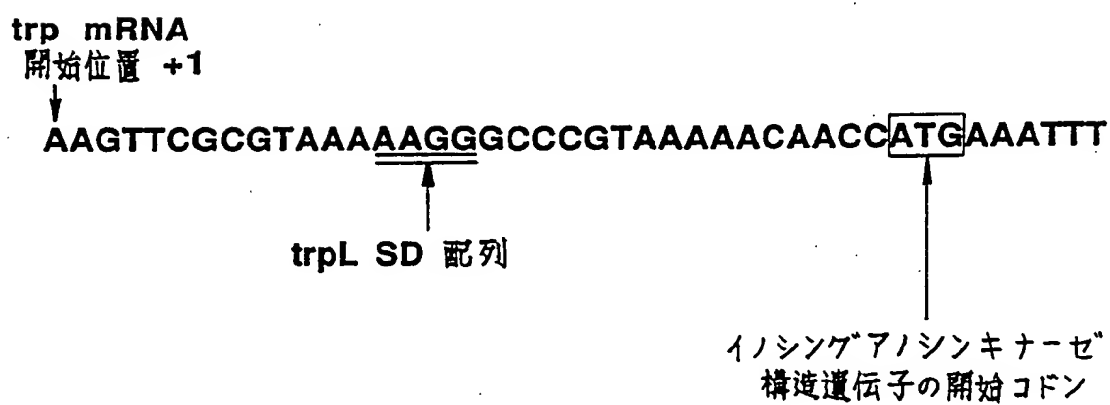


7/8

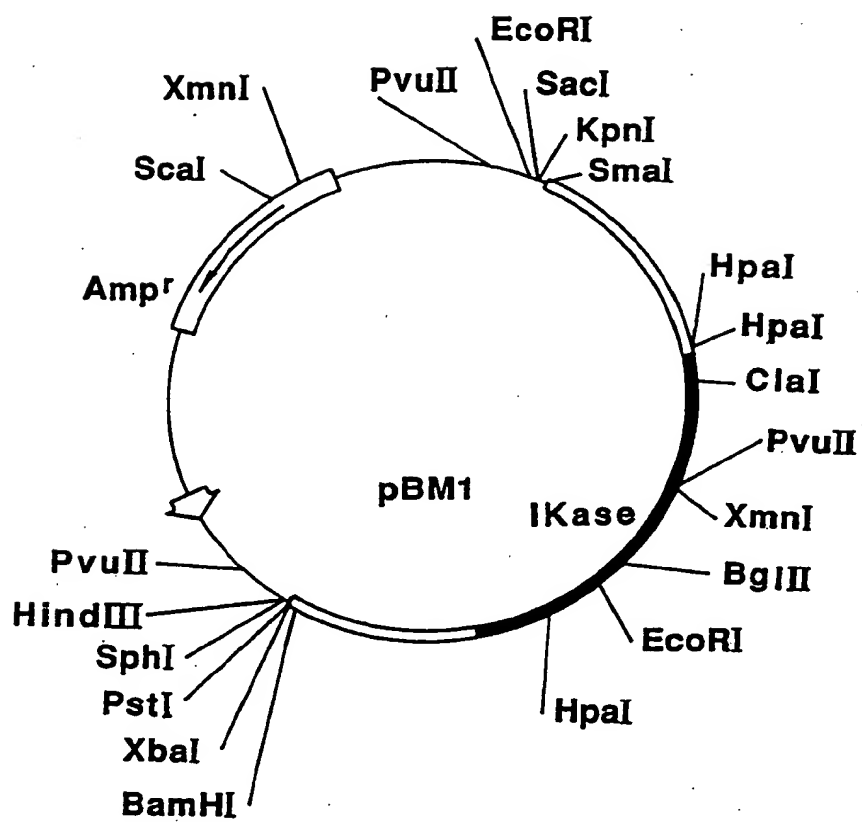
第 7 図



第 8 図



第 9 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP90/01567

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int. Cl⁵ C12N9/12, C12N15/54, C12N1/21, C12P19/32// (C12N9/12, C12R1:19) (C12N15/54, C12R1:19) (C12N1/21, C12R1:19) (C12P19/32, C12R1:19)		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
IPC C12N9/12, C12N15/00-15/90, C12N1/21, C12P19/32		
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
COMPUTER SEARCH (CHEMICAL ABSTRACTS AND BIOSIS DATABASES)		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category ¹⁰	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X, Y	Journal of General Microbiology, Vol. 135, No. 5, (1989), B. Hove-Hensen, et al. [Role of Guanosine Kinase in the Utiloza- tion of Guanosine for Nucleotide Synthesis in Escherichia coli] p. 1263-1271	1-17
X, Y	Chemical Abstracts, Vol. 68, (1968), K. J. Pierre, et al. [Formation of inosine 5'-monophaosphate by a Kinase in cell-free extracts of Ehrlich ascites cell in vitro] Refer to Abstract No. 102069a, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1968. 127(2)432-40	12-14
X, Y	JP, A, 57-110194 (Ajinomoto Co., Inc.), July 8, 1982 (08. 07. 82), (Family: none)	12, 15-16
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>¹⁰ Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search February 15, 1991 (15. 02. 91)		Date of Mailing of this International Search Report March 4, 1991 (04. 03. 91)
International Searching Authority Japanese Patent Office		Signature of Authorized Officer

国 際 調 査 報 告

国際出願番号PCT/JP 90/01567

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. ⁵ C12N9/12, C12N15/54, C12N1/21, C12P19/32 (C12N9/12, C12R1:19) (C12N15/54, C12R1:19) (C12N1/21, C12R1:19) (C12P19/32, C12R1:19)		
II. 国際調査を行った分野		
調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料		
分 類 体 系	分 類 記 号	
IPC	C12N9/12, C12N15/00-15/90, C12N1/21, C12P19/32	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
COMPUTER SEARCH(CHEMICAL ABSTRACTS AND BIOSIS DATABASES)		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
X. Y	Journal of General Microbiology, 第135巻, 第5号, (1989) B. Hove-Hansen, et al 「Role of Guanosine Kinase in the Utilization of Guanosine for Nucleotide Synthesis in Escherichia coli」 p.1263-1271	1-17
X. Y	Chemical Abstracts, 第68巻, (1968), K. J. Pierre, et al 「Formation of inosine 5' - monophosphate by a Kinase in cell-free extracts of Ehrlich ascites cell in vitro」 要約番号102069 参照, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1968, 127(2)432-40	12-14
X. Y	JP. A57-110194 (味の素株式会社), 8. 7月, 1982(08. 07. 82), (ファミリーなし)	12. 15-16
※ 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリーの文献		
IV. 証 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
15. 02. 91	04.03.91	
国際調査機関	権限のある職員	4 B 7 8 2 3
日本国特許庁 (ISA/JP)	特許庁審査官	平 田 和 男